مقاله پژوهشي

بررسی مورد-شاهدی ارتباط بین پلی‌مورفیسم A234T ژن SEPP1 و سطح گلوکز، سلنوپروتئین P و شاخص‌های استرس اکسداتیو افراد مبتلا به دیابت نوع ۲

فرانک آریائی[۱]، محسن فیروزرای*[۲]، سعید کلباسی[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۰۷/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی Ala234Thr در ژن SEPP1 می‌تواند بر سطح ظرفیت استرس اکسیداتیو و همچنین بر میزان سلنیوم سرم اثرگذار باشد، از طرفی میزان گلوکز و انسولین خون نقش تنظیمی برای بیان ژن SEPP1 دارند. این فرضیه مطرح می‌شود که احتمالاً این پلی‌مورفیسم ارتباط مشخصی با بروز دیابت دارد. مطالعه حاضر باهدف تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم Ala234Thr در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و اثر آن بر سطح گلوکز، سطح سلنوپروتئین p و همچنین وضعیت استرس اکسیداتیو بیماران انجام شده است.

مواد و روش کار: در این مطالعه مورد شاهدی شاخص‌های بیوشیمیایی (FBS & HbA1C) شاخص‌های استرس اکسیدایو (MDA و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توتال) سرمی در دو گروه بیمار و سالم اندازه‌گیری شد و جهت تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم A234T از روش Tetra-ARMS PCR استفاده شد.

یافته‌ها: ارتباط معنی‌داری بین شاخص‌های دموگرافیک (سن و جنسیت) با بروز دیابت نوع ۲ مشاهده نشد، اما با شاخص‌های بیوشیمیایی و استرس اکسیداتیو ارتباط معنی‌داری مشاهده شد (p=0.001). نتایج ژنوتایپینگ نشان داد فراوانی ژنوتیپ GG در گروه کنترل بیشتر از گروه بیمار است اما ازلحاظ آماری معنی‌دار نشد. همچنین مشخص شد خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ در افراد با ژنوتیپ GA ۲،۱۴ برابر بیشتر از سایرین است (p=0.035)

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج، فرضیه‌ی تأثیرگذاری سطوح بالای SeP بر پاتوژنز دیابت نوع ۲ از طریق مسیرهای استرس اکسیداتیو را مطرح می‌نماید .پلی‌مورفیسم rs3877899با افزایش خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ در افراد موردمطالعه مرتبط می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: دیابت، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی، استرس اکسیداتیو، هایپرگلیسمی، Tetra-ARMS PCR

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره ششم، ص ۴۳۶-۴۲۸ ، شهریور ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: شاهرود، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی واحد شاهرود، گروه بیوشیمی بالینی تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۹۰۳۸۰

Email: firoozraim@yahoo.com

مقدمه

رایج‌ترین نوع دیابت، دیابت نوع ۲ (دیابت شیرین) است. در این افراد برخلاف افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ که لوزالمعده توان ساخت انسولین را ندارد، انسولین در بدن ترشح می‌شود اما یا میزان آن به حد لازم نیست یا سلول‌ها قادر به دریافت انسولین نیستند. (۱) این بیماری یکی از شایع‌ترین و هزینه‌سازترین بیماری‌های مزمن در جهان است که میزان شیوع آن به علت تغییرات سبک زندگی و بهبود شرایط بهداشتی –درمانی جوامع که منجر به افزایش میزان بقا شده است، رو به افزایش می‌باشد. تخمین‌ها نشان می‌دهند تا سال ۲۰۴۰ تعداد مبتلایان به دیابت نوع ۲ به ۶۴۲ میلیون نفر برسد، این در حالی است که در سال ۲۰۱۴ شمار این افراد ۴۲۲ میلیون نفر بوده است. طی یک دهه گذشته، شیوع دیابت به دلیل افزایش میانگین سنی جامعه، سابقه وراثت، عادات غذایی ناسالم، کم‌تحرکی و افزایش چاقی متناسب با رشد شهرنشینی به سرعت افزایش یافته است. (۲) در ایران نیز جمعیت مبتلایان به دیابت رو به افزایش است، شیوع این بیماری از سال ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۱، ۳۵ درصد افزایش یافته است و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰، تعداد مبتلایان به این بیماری به ۹،۲ میلیون نفر برسد. (۳) دیابت از طرق مختلف باعث به وجود آمدن عوارض بیماری در فرد می‌شود اما مهم‌ترین این عوامل، افزایش

[۱] کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران

[۲] استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شاهرود، شاهرود، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] دانشیار، متخصص غدد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات غدد درون ریز، تهران، ایران

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

غلظت گلوکز خون (هایپرگلیسمی) است. هایپرگلیسمی می‌تواند باعث طیف گسترده‌ای از تغییرات در بدن شود. یکی از این تغییرات مهم که در ایجاد علائم دیابت نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و القاء استرس اکسیداتیو در سلول‌ها است. استرس اکسیداتیو در اثر عدم توازن تولید رادیکال‌های آزاد و توان آنتی‌اکسیدانی بدن ایجاد می‌شود. استرس اکسیدایتو نقش مهمی را در عوارض عروقی دیابت به‌ویژه دیابت نوع ۲ دارد. رادیکال‌های آزاد به دلیل توانایی در آسیب رساندن به DNA ، پروتئین‌ها و چربی‌ها، در شروع و پیشرفت عوارض دیابت نقش اصلی را دارا می‌باشند. این عوارض شامل بیماری عروقی کرونری، نوروپاتی، نفروپاتی، ریتنوپاتی می‌باشند، مطالعات نقش هایپرگلیسمی را در ایجاد استرس اکسیدایتو که منجر به نارسایی اندوتلیال در عروق خونی بیماران دیابتی می‌شود، نشان می‌دهد (۴،۵). همچنین دیابت شیرین با اختلال در پروفایل لیپیدی بدن، سلول‌ها را مستعد پراکسیداسیون لیپیدی می‌نماید. مطالعات نشان داده‌اند که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند علائم ناشی از دیابت نوع ۲ را تا حدی کاهش دهد و در کنترل بیماری نقش داشته باشد. طیف وسیعی از آنتی‌اکسیدان‌ها اگزوژن و سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی اندوژن در بدن وجود دارند، که مهم‌ترین آن‌ها، آنزیم‌های: کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز هستند. (۶) یکی از آنتی‌اکسیدان‌های اگزوژن عنصر سلنیوم Se است. سلنیوم یک عنصر ضروری در سلامتی است که نقش خود را در سلول در غالب سلنوپروتئین‌ها (SeP) ایفا می‌کنند، این پروتئین‌ها واجد اسید آمینه سلنوسیستئن هستند، این اسید آمینه مشابه سیستئین است ولی به جای گوگرد در ریشه جانبی آن عنصر سلنیوم قرار دارد. (۷) پروتئین‌هایی که واجد اسید آمینه سلنوسیستئن باشند را سلنوپروتئین می‌نامند، تا کنون بیش از ۲۰ سلنوپروتئین مختلف شناسایی شده است. سلنوپروتئین ها در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بیوسنتز دزوکسی ریبونوکلئوتیدها، احیای پروتئین‌های اکسید شده در غشاء، تنظیم آپوپتوز، تنظیم ایمنی، تنظیم هورمون‌های تیروئید، انتقال ذخیره سلنیوم، تاخوردگی پروتئین‌ها و تجزیه‌ی پروتئین‌های با تاخوردگی غلط نقش دارند. (۸) مهم‌ترین سلنوپروتئین هایی که در استرس اکسیداتیو دخیل‌اند عبارت‌اند از: گلوتاتیون پراکسیداز ها، تیوردوکسین ردوکتاز و سلنوپروتئین p (SeP). از این میان سلنوپروتئین p با دارا بودن بیش از ۱۰ ریشه سلنوسیستئینی هم در سیستم استرس اکسیداتیو نقش دارد و هم انتقال دهنده سلنیوم بین بافت‌های مختلف می‌باشد. سلنو پروتئین p حاوی 6-7 mg/dl سلنیوم پلاسما است در حالیکه سطح پلاسمایی سلنیوم درمجموع سلنوپروتیئن ها حدود 8 mg/dl می‌باشد. (۹) مطالعات نشان داده‌اند افزایش سطح گلوکز، اثر تنظیمی مثبت و انسولین اثر تنظیمی منفی بر روی بیان ژن SEPP1 دارد از طرفی مقادیر بالای SeP باعث کاهش انسولین و افزایش گلوکز خون می‌شود، همچنین درمان با انسولین باعث کاهش بیان SEPP1 در سطح mRNA و در نتیجه کاهش SeP می‌شود. (۱۰-۱۱) در مطالعات دیگر مشاهده شد که تزریق SeP انسانی در غلظتی مانند افراد دیابتی، باعث مهار پیام رسانی انسولین و القای هایپرگلیسمی درموش های سالم در طی انجام تست تحمل گلوکز می‌شود. همچنین سطح بالای SeP با تأثیر بر روی سلول‌های β پانکراس باعث کاهش ترشح انسولین می‌شود. (۱۲) تمامی این شواهد نشان‌دهنده‌ی نقش SeP به عنوان آغاز گر و عامل پیشرفت دیابت است. ژن کُد کننده این پروتئین در موقعیت 5p12 قرار گرفته است و واجد ۷ اگزون است، بیشترین بیان را در کبد دارد. در ناحیه کُد کننده این ژن یک پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در موقعیت 234 وجود دارد که در تنظیم میزان سلنیوم پلاسما نیز نقش دارد. (۱۳) در واقع این پلی‌مورفیسم یک تغییر A/G بوده و به یک تغییر آمینواسیدی آلانین – ترئونین در کدون ۲۳۴ منجر می‌گردد. این پلی‌مورفیسم، نسبت ایزوفرم های SeP در پلاسما را تحت تأثیر قرار می‌دهد، به طوری که آلل ماژور G با تولید ایزوفرم ۵۷ کیلودالتونی (غنی از سلنیوم) مرتبط است، در حالیکه الل A با تولید ایزوفرم ۴۹ کیلو دالتونی (سلنیوم پائین) مرتبط می‌باشد. در واقع این پلی‌مورفیسم می‌تواند، بر میزان تحویل سلنیوم به بافت‌ها و در نتیجه تولید سایر سلنوپروتئین ها با خاصیت آنتی‌اکسیدانی اثر بگذارد. (۱۴) علاوه بر این مطالعات اخیر ارتباط بین سطح سلنیوم و میزان بروز دیابت را نیز مورد بررسی قرار داده‌اند. با توجه به اثرگذاری پلی‌مورفیسم Ala234Thr، هم بر سطح استرس اکسیداتیو و هم بر میزان سلنیوم سرم، این فرضیه مطرح می‌شود که احتمالاً این پلی‌مورفیسم ارتباط مشخصی با بروز دیابت دارد، بنابراین شناسایی این پلی‌مورفیسم می‌تواند به عنوان یک عامل پیش آگهی در افراد استفاده شود. از این رو مطالعه‌ی حاضر باهدف تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم Ala234Thr در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ و همچنین اثر آن بر سطح گلوکز، سطح سلنوپروتئین p و همچنین وضعیت استرس اکسیداتیو بیماران انجام شده است.

مواد و روش کار

جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش مورد شاهدی، شامل ۱۰۰ فرد مبتلا به دیابت نوع ۲ به عنوان گروه بیمار و ۱۰۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل که به کلینیک سلامت تابان مراجعه کرده‌اند، می‌باشد. معیار انتخاب افراد گروه بیمار شامل: ۵ سال سابقه ابتلا به دیابت نوع ۲، سطح FBS>126 mg/dl و میزان

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

HbA1c>6.5% بود. گروه کنترل نیز افرادی با ویژگی‌های کلینیکو پاتولوژیکی سالم بوده‌اند که هیچگونه سابقه ابتلا به دیابت را نداشته و فقط برای چکاپ دوره‌ای به آزمایشگاه مراجعه کرده‌اند. پس از اخذ رضایت نامه‌ی کتبی از بیماران و افراد سالم و با رعایت ۸ ساعت ناشتای کامل، مقدار 10 CC خون وریدی بدون اضافه کردن ضد انعقاد برای تهیه‌ی سرم و مقدار 3CC خون همراه با ضد انعقاد EDTA برای اندازه‌گیری HbA1C و همچنین استخراج DNAاز گلبول‌های سفید گرفته شد .سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور 3000 × g برای جدا کردن سرم از لخته انجام شده و بعد از انجام تست اندازه‌گیری قندخون در همان روز، سرم در دمای- 20°C نگهداری شده است .نمونه خون حاوی ضد انعقاد بعد از انجام تست HbA1C در همان روز در یخچال آزمایشگاه نگهداری شده است. در این مطالعه میزان FBS به روش آنزیمی گلوکز اکسیداز و توسط کیت دلتا درمان پارت و طبق پروتکل کیت انجام شد، همچنین میزان HbA1c به روش HPLC اندازه‌گیری شد. جهت بررسی فعالیت استرس اکسیداتیو، میزان MDA و ظرفیت توتال آنتی‌اکسیدانی به روش کالریمتری با استفاده از کیت طب پژوهان رازی و همچنین میزان سلنوپروتئین P سرم نیز با استفاده از روش ساندویچ-الایزا و توسط کیت Zellbio در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم Ala234Thr به روش Tetra-ARMS PCR ارزیابی شد. جهت اعتبار سنجی نتایج Tetra-ARMS تعدادی از نمونه‌ها به روش سنگر سکانس شدند. بدین منظور ابتدا DNA ژنومیک از خون محیطی و توسط کیت Blood DNA Extraction GTP استخراج شد و پس از بررسی کیفیت و کمیت، با دو جفت پرایمر شامل: پرایمر فوروارد خارجی 5'-CCATCGCCTCATTACCATCATGAGC-3' ریورس خارجی 5'-GAAGTCCCTGTCAGCTACATAAAGATGGG-3' به عنوان پرایمرهای خارجی و فوروارد داخلی 5'-GAATCAGCAACCAGGAGCACCAAGTT-3'و ریورس داخلی 3'-5'- AGCAGGATGAGTAGGCGC به عنوان پرایمرهای داخلی، واکنش PCR در دستگاه ترموساکلر peQlab STAR 2X انجام شد و نتایج بر روی ژل آگارز ۱،۵ درصد بررسی شدند. آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۲۵ صورت گرفت (Chicago IL, USA). برای مقایسه توزیع فراوانی ژنوتیپ ها و آلل های ژن سلنوپروتئین P در دو گروه بیمار و کنترل از آزمون square-chi استفاده شده است و در تمامی آزمون‌های آماری میزان P.Value≤0.05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شاهرود با شناسه IR.IAU.SHAHROOD.REC.1398.057 تصویب شده است و تمامی اصول اخلاقی پژوهشی در ارتباط با افراد شرکت کننده در این مطالعه رعایت شده است.

یافته‌ها

در این پژوهش شاخص‌های دموگرافیک شامل جنسیت و سن، شاخص‌های بیوشیمیایی شامل FBS و HbA1C و شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل MDA، ظرفیت توتال آنتی‌اکسیدانی و سلنوپروتئین P در دو گروه مبتلایان به دیابت نوع ۲ و گروه کنترل بررسی و مقایسه شد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود ارتباط معنی‌داری بین سن، جنسیت و دیابت نوع ۲ مشاهده نشد. از طرفی بین شاخص‌های بیوشیمایی (FBS & HbA1C)، شاخص‌های استرس اکسیداتیو (MDA، ظرفیت توتال آنتی‌اکسیدانی و سلنوپروتئین P) و دیابت نوع ۲ ارتباط معنی‌داری مشاهده شد.

جدول (۱): بررسی و مقایسه شاخص‌های دموگرافیک، بیوشیمیایی و استرس اکسیداتیو

متغیر	گروه بیمار تعداد کل: ۱۰۰ نفر	گروه سالم تعداد کل: ۱۰۰ نفر	P.Value ≤۰،۰۵
سن	۷،۱±۵۷،۳۸	۵،۵۱±۵۶،۲۳	۰،۲۰۲
جنس	زن: ۵۱(٪۵۱) مرد:۴۹(٪۴۹)	زن: ۴۰(٪۴۰) مرد: ۶۰(٪۶۰)	۰،۱۱۸
×قند خون ناشتا (FBS) Mg/dl	۱۳۱(۳۸۰-۷۲)	۸۹،۵(۹۹-۶۰)	۰،۰۰۱
HbA1C×× %	۸،۴±۱،۸	۴،۹۲±۰،۴۹	۰،۰۰۱

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

×مالون دی آلدهید (MDA) (uM)	(۹-۶۵)۱۸،۱۸	(۵-۳۲)۱۲،۷۳	۰،۰۰۱
××ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (mM)	۱،۳±۲،۸۸	۱،۰۴±۲،۱	۰،۰۰۱
××سلنوپروتئین p (ng/ml)	۳۴،۲±۲۸۱،۰۳	۱۸،۷±۱۸۹،۵	۰،۰۰۱

×گزارش شده به صورت میانگین ± انحراف از معیار

×× گزارش شده به صورت میانه (کمینه-بیشینه)

در این پژوهش تعیین ژنوتایپ پلی‌مورفیسم rs3877899 به روش Tetra-ARMS-PCR انجام و نتایج روی ژل آگارز بررسی شد، همچنین جهت راستی آزمایی تعدادی از هر ژنوتیپ سکانس شدند (شکل ۱) نتایج مرتبط با آزمون هاردی-واینبرگ نشان داد که فراوانی ژنوتیپ ها در جمعیت کل از تعادل هاردی-واینبرگ پیروی نمی‌کند. ژنوتایپینگ در دو گروه بیمار و کنترل به روش Tetra-ARMS انجام شد و فراوانی ژنوتیپی و آللی محاسبه شد. نتایج نشان داد فراوانی ژنوتیپ GG در گروه کنترل بیشتر از بیمار بود اما ازلحاظ آماری معنی‌دار نشد. برای بررسی نقش پلی‌مورفیسم rs3877899 در ریسک دیابت نوع ۲ از نسبت شانس (OR (با محدوده اطمینان ۹۵ درصد استفاده شده است. افراد دارای ژنوتیپ GG به عنوان ژنوتیپ مرجع در نظر گرفته شده است، یافته‌های جدول ۲۵ نشان می‌دهد که خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ در افراد دارای ژنوتیپ GA ۲،۱۴ برابر بیشتر است (P=۰،۰۳۵) درصورتیکه افراد دارای ژنوتیپAA ۱،۵ برابر شانس ابتلای بیشتری به دیابت دارند اما از نظر آماری ارتباط معنی‌داری را نشان نداد همانگونه که در جدول ۲ ملاحظه می‌شود، آلل G به طور معنی‌داری در افراد سالم بیشتر است. در مقابل آلل A در بیماران فراوانی بیشتری دارد (P=۰،۰۰۱) در مقابل با در نظر گرفتن آلل G به عنوان آلل مرجع، آلل A با خطر ابتلا به دیابت رابطه معنی‌داری ندارد.

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم rs3877899

ژنوتایپ	گروه بیمار تعداد کل = ۱۰۰ تعداد (درصد)	گروه کنترل تعداد کل = ۱۰۰ تعداد (درصد)	OR (CI 95%)	P-Value	P-Value
GG	(٪۱۵) ۱۵	(٪۲۷) ۲۷	-	-	-
GA	(٪۸۰) ۸۰	(٪۶۷) ۶۷	(۴،۳-۱،۰۵) ۲،۱۴	۰،۰۳۵	۰،۱۱۸
AA	(٪۵) ۵	(٪۶) ۶	(۵،۷-۰،۳۹) ۱،۵	۰،۵۵	-
آلل					
A	(٪۴۵) ۹۰	(٪۳۹،۵) ۷۹	(۹۵-۰،۴) ۱،۲۵		
G	(٪۵۵) ۱۱۰	(٪۶۰،۵) ۱۲۱		۰،۳۱	۰،۰۰۱

جهت مقایسه میانگین پارامترهای بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی در ژنوتیپ های مختلفrs3877899 : برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، سلنوپروتئین p و هموگلوبین A1C از آزمون ANOVAاستفاده شد. همانطور که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود، تفاوت معنی‌داری بین سطح سرمی موارد ذکر شده و ژنوتیپ های rs3877899 در افراد بیمار وجود ندارد، اما افراد سالم با ژنوتیپ AAمقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توتال بالاتر و هموگلوبین HbA1Cکمتری داشتند (به ترتیب P=۰/۰۲۱ و P=۰/۰۰۲). برای مقایسه سطح سرمی MDA و FBS در ژنوتیپ های مختلف نیز از روش غیر پارامتریک استفاده شد. افراد با صدک بالای MDA و FBSبه ترتیب بیشتر دارای ژنوتیپ GG و GA بودند (جدول ۴) با این حال، نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین سطح سرمی این موارد در ژنوتیپ های مختلفrs3877899 وجود ندارد.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

جدول ۳: بررسی ارتباط بین ژنوتیپ های پلی‌مورفیسم rs3877899 و پارامترهای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، سلنوپروتئین P و HbA1C

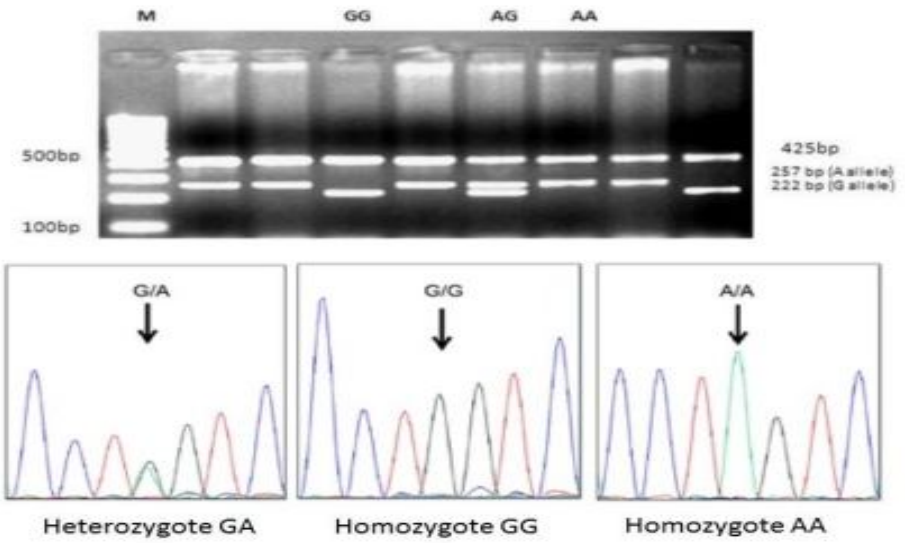
ژنوتیپ های rs3877899		ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (mM)	سلنوپروتئین P (ng/ml)	HbA1C (%)
GG	بیمار	۳،۲۳±۱،۵	۲۷۱،۵±۵۲،۹۱	۸،۳۴±۱،۵۵
	کنترل	۲،۱۱±۰،۹۶	۱۹۹،۴۳±۱۴،۷۹	۴،۹۱±۰،۶۱
GA	بیمار	۲،۸۱±۱،۲۹	۲۸۱،۰۳±۳۳،۴۵	۸،۴۲±۱،۸۹
	کنترل	۲،۱۱±۱،۰۱	۱۸۶،۰۴±۱۹،۷۴	۴،۹۹±۰،۴
AA	بیمار	۲،۹±۱،۱۷	۲۹۴،۵۱±۲۴،۷	۸،۵۲±۱،۱۲
	کنترل	۳،۳۲±۱،۲۶	۱۹۷،۷±۸،۸۷	۴،۲۷±۰،۵
P.Value	بیمار	۰،۵۴۷	۰،۶۸۸	۰،۹۷۹
کنترل		۰،۰۲۱	۰،۰۹۷	۰،۰۰۲

گزارش شده به صورت انحراف میانگین ± معیار

جدول (۴): بررسی ارتباط بین ژنوتیپ های پلی‌مورفیسم rs3877899 و پارامترهای MDA و FBS

ژنوتیپ های rs3877899		MDA(uM)	FBS (ng/ml)
GG	بیمار	(۳۲-۱۰)۱۹،۴۲	(۳۸۰-۸۱)۱۲۶
	سالم	(۳۲-۷) ۱۲،۷۳	(۳۸-۸۰) ۱۲۱
GA	بیمار	(۶۵-۹) ۱۸،۱۸	(۳۶۰-۷۲) ۱۳۲،۵
	سالم	(۲۴-۵) ۱۲،۱۳	(۳۱۵-۶۰) ۹۸
AA	بیمار	(۲۴-۱۰) ۱۴،۶۴	(۱۰۶-۱۷۹) ۱۳۱
	سالم	(۱۷-۱۳) ۱۳،۸۳	(۱۰۵-۸۵) ۹۲
P.Value	بیمار	۰،۸۷۵	۰،۳۶۳
سالم		۰،۰۳۷	۰،۱۹۵

گزارش شده به صورت (بیشینه-کمینه)میانه



شکل (۱): بررسی نتایج Tetra-ARMS PCR بر روی ژل آگارز ۱،۵ درصد و راستی آزمایی ژنوتیپ های به دست آمده از این تکنینک به روش sanger sequencing

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات مختلف سلنوپروتئین P به عنوان یک هدف بالقوه و امیدبخش برای درمان بیماری‌های مرتبط با مقاومت انسولینی از جمله دیابت نوع دو در نظر گرفته شده است. (۱۵) به عنوان مثال متفورمین به عنوان یکی از داروهایی که در خط اول درمانی دیابت مورد استفاده قرار می‌گیرد می‌تواند بیان mRNA و ترشح سلنوپروتئین P را کاهش دهد. (۱۶) سلنوپروتئین P به عنوان یک عامل تنظیم کننده پاسخ‌های التهابی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در روند بیماری زایی دیابت بر عهده دارد. برخی مطالعات به اثر پلی‌مورفیسم ژن سلنوپروتئینP بر عملکرد و میزان ترشح ایزوفرم های مختلف سلنوپروتئین P اشاره کرده‌اند. (۱۷) مطالعه‌ی حاضر باهدف بررسی تعیین فراوانی پلی‌مورفیسمrs3877899 در ژن سلنوپروتئین P در بیماران دیابتی تیپ دو و ارتباط آن با سطح سلنوپروتئینP ، گلوکز و وضعیت استرس اکسید اتیو انجام گرفته است. بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم بر روی دو گروه افراد شامل گروه بیمار و گروه کنترل انجام گرفت، فراوانی ژنوتیپ ها در افراد مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. هرچند، با در نظر گرفتن ژنوتیپ GG به عنوان ژنوتیپ رفرانس، ژنوتیپ GA با افزایش خطر ابتلا به دیابت همراه بود (P=۰/۰۳۵). بررسی فراوانی آلل های پلی‌مورفیسم rs3877899 نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین آلل G و A با خطر ابتلا به دیابت نوع دو وجود ندارد. ولی تفاوت معنی‌داری در بین فراوانی آلل ها در دو گروه وجود داشت، به طوری که آلل A به عنوان آلل جهش یافته در افراد بیمار فراوانی بیشتری داشت. با در نظر گرفتن نتایج ذکر شده، تا حدی می‌توان نتیجه گرفت افرادی که حامل آلل A می‌باشند به نظر می‌رسد خطر بیشتری نسبت به حاملین آلل G برای ابتلا به دیابت دارند. در مطالعات مشابه Cinemre و همکاران گزارش داده‌اند که فراوانی پلی‌مورفیسم rs3877899 در مادران باردار مبتلا به دیابت بارداری با مادران باردار سالم تفاوت معنی‌داری نداشت. با این حال سطح سرمی سلنوپروتئین P در افراد مبتلا به دیابت بارداری به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم بود که نشانگراثر سلنوپروتئین P در بیماری زایی دیابت می‌باشد. (۱۸) به نظر می‌رسد اثر پلی‌مورفیسم rs3877899بر بیماری زایی دیابت به اثر آن بر فعالیت سلنوپروتئین Pو نسبت ایزوفرم های مختلف سلنوپروتئین مربوط می‌باشد. این تعدیل اثر سلنوپروتئین توسط پلی‌مورفیسم rs3877899 باعث اثرگذاری آن بر انتقال سلنیوم در بافت‌های مختلف می‌شود. هایپرگلاسمی در دیابت معمولاً با افزایش تولید رادیکالهای آزاد و یا کاهش دفاع علیه اکسیداسیون همراه می‌باشد. افزایش در سطح رادیکال‌های آزاد سبب صدمه به پروتئین‌های سلولی، لیپیدهای غشاء، اسیدهای نوکلئیک و نهایتاً مرگ سلولی می‌شود. (۱۹) در این مطالعه مقدار سلنوپروتئین P چه در افراد دیابتی و چه در افراد سالم تفاوت معنی‌داری در بین ژنوتیپ های مختلف rs3877899 را نشان نداد. مقدار دریافتی سلنیوم یک عامل مؤثر در سطح سلنوپروتئین P می‌باشد و کم بودن دریافت سلنیوم غذایی در افراد شرکت کننده می‌تواند علت نتیجه غیرمعنی‌دار فعلی باشد. در نتیجه در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود که دریافت سلنیوم غذایی نیز بررسی شود. در بیماران دیابتی مقدار قند خون ناشتا سرم بالاتر از افراد سالم می‌باشد (p=۰/۰۰۱) در افراد دیابتی و سالم FBSدر ژنوتیپGA مقادیر بالاتری را نشان داد. با این حال تفاوت سطح سرمی FBS بین ژنوتیپ های مختلف پلی‌مورفیسم rs3877899 در هیچ یک از گروه‌ها معنی‌دار نبود. با بررسی هموگلوبین A1C مشخص گردید سطح این مارکر در افراد سالم با ژنوتیپ GA و GG نسبت به ژنوتیپ AA به طور معنی‌داری بالاتر بود (P=۰/ ۰۰۲) در مقابل، تفاوت‌ها در افراد بیمار معنی‌دار نبود. از سوی دیگر اثر خود ژنوتیپ های GA و GG در این تفاوت می‌تواند مؤثر باشد. Donadioو همکاران نشان دادند پلی‌مورفیسمrs3877899 می‌تواند سطح گلوکز خون را تنظیم کند به طوریکه افراد با آلل A مقدار FBS کمتری داشتند. (۲۰) در مقابل Gharipour و همکاران گزارش دادند که پلی‌مورفیسم rs3877899 بر سطح گلوکز خون در افراد مبتلا به سندرم متابولیک مؤثر نمی‌باشد تفاوت جمعیت مورد مطالعه می‌تواند علت این تفاوت در نتایج باشد. (۲۱) ژن SEPP1 در بسیاری از بافت‌ها بیان می‌شود، اما به‌طور عمده توسط کبد سنتز و ترشح می‌شود. مطالعات نشان داده است، بیان SEPP1 در جزایر لانگرهانس پس از مواجهه با گلوکز بالا، کاهش یافته است. مکانیسم زمینه‌ای این ارتباط و متابولیسم گلوکز ممکن است به وجود یک مکان اتصال دهنده برای فاکتور رونویسی FoxO1 در پروموتر ژن SEPP1 مرتبط باشد. (۲۲) این فاکتور رونویسی بیان آنزیم‌های گلوکونوژنیک، مانند گلوکز ۶-فسفاتاز و فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز را تنظیم می‌کند. این مشاهدات نشان می‌دهد که SeP یک عامل مهم تنظیم کننده متابولیسم گلوکز است. بنابراین می‌توان انتظار داشت که پلی‌مورفیسم های این ژن می‌توانند در تنظیم متابولیسم گلوکز نقش داشته باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد، در افراد دیابتی مقدار MDA در ژنوتیپ GA بالاتر می‌باشد و در افراد سالم مقدار MDA در ژنوتیپAA مقدار بالاتری داشت. با این حال تفاوت سطح سرمی MDA بین ژنوتیپ‌های مختلف فقط در افراد سالم ازلحاظ آماری معنی‌دار شد

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

(P=۰/۰۳) این نتـایج با مطالعات مشـــابه دیگری که در نیوزلند و برزیل انجام شده بود مطابقت داشت. در این مطالعه برای اولین بار و بـه‌طور مســـتقیم ارتبـاط این پلی‌مورفیســـم و میزان ظرفیـت آنتی‌اکسـیدانی تام در سـرم افراد مبتلا به دیابت مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در ژنوتیپ GGبیماران دیابتی و ژنوتیپ AA افراد سالم بالاتر بود. با این حال تفاوت سطوح فقط در گروه سالم معنی‌دار می‌باشد p=۰/۰۲ مانند MDA، در اینجا نیز به نظر می‌رسـد سایر عوامل محیطی مؤثر بر التهاب در بیماران دیابتی علت تفاوت در این نتایج باشـد. بررسـی میانگین میزان سـلنوپروتئین P سـرم خون در دو گروه دیابتی و سـالم مشـخص گردید که میزان سـلنوپروتئین P سـرم خون افراد دیابتی به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم می‌باشد(p=۰/۰۰۱ با این حال رابطه خطی بین سـطح سـلنوپروتئین P و شاخص‌های گالیسـمیک (FBS و HbA1C) مشـاهده نشـد. نتایج مشابه و در برخی مواقع ضـد و نقیض در برخی مطالعات دیگر مشـاهده شـد . Misuو همکاران پیشنهاد دادند که تولید بیش از حد سلنوپروتئین P با مقدار قند خون ناشـــتا رابطه مســـتقیم خطی دارد. (۲۳) مکانیسـم‌های مولکولی که توسـط آن‌ها دیابت نوع ۲ سـطح خونی سـلنوپروتئین P را افزایش می‌دهد، کاملاً درک نشـده است. با این حال، شواهد متعددی نشان داده‌اند که انسولین به طور چشمگیری تولید سـلنوپروتئین Pدر سـلولهای کبدی را سرکوب می‌کند این مشاهدات نشان می‌دهد که کاهش عملکرد انسولین در کبد ممکن اسـت باعث افزایش میزان گردش خون سلنوپروتئین P در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ شود. (۲۴)

به طور کلی نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان دادکه میزان قند خون ناشتا (FBS)، هموگلوبینHbA1C ،MDA، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی توتال و ســلنوپروتئین P در بیماران دیابتی بالاتر از افراد ســالم می‌باشـد و با توجه به ارتباط مستقیم و معنی‌دار آن با شاخص‌های هایپرگلیسـمی و اسـترس اکسیداتیو، فرضیه‌ی تأثیرگذاری سطوح بالایSeP بر پاتوژنز دیابت نوع ۲ از طریق مســیرهای اســترس اکسیداتیو را مطرح می‌نماید .پلی‌مورفیسم rs3877899 با افزایش خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ در افراد مورد مطالعه مرتبط می‌باشد.

از محدودیت‌های این بررســی می‌توان به تعداد نمونه اشــاره کرد، از این رو انجـام مطالعات تکمیلی بر روی جمعیت‌های بزرگتر و اقوام مختلف ضروری است و می‌تواند منجر به تعیین نقش دقیق این پلی‌مورفیسم در دیابت نوع ۲ شود.

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم کلینیک تابان و تمامی جمعیت مورد مطالعه کـه بـا در اختیار قرار دادن نمونه و اطلاعات بالینی در این مطالعه سهم بزرگی داشتند صمیمانه تقدیر و تشکر مینمائیم.

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد نویسنده اول مقاله در دانشـگاه علوم پزشـکی آزاد اسـلامی واحد شـاهرود می‌باشد و منبع مالی آن را دانشجو تأمین کرده است.

References:

1. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. Lancet 2017;389(10085):2239-51.
2. Edelman SV, Polonsky WH. Type 2 diabetes in the real world: the elusive nature of glycemic control. Diabetes Care 2017;40(11):1425-32.
3. Goodarzi M, Ebrahimzadeh I, Rabi A, Saedipoor B, Jafarabadi MA. Impact of distance education via mobile phone text messaging on knowledge, attitude, practice and self efficacy of patients with type 2 diabetes mellitus in Iran. J Diabetes Metab Disord2012;11(1):10.
4. Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maidi I. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. Can J Diabetes 2015;39(1):44-9.
5. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. JAMA 2006;295(14):1681-7.
6. Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. Diab Vasc Dis Res2011;8(1):22-8.
7. Sordillo LM. Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. Vet Med Int 2013;2013:154045.
8. Burk RF, Hill KE, Motley AK. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. J Nutr 2003;133(5):1517S-20S.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

9. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P—expression, functions, and roles in mammals. Biochim Biophys Acta 2009;1790(11):1441-7.
10. Mao J, Teng W. The relationship between selenoprotein P and glucose metabolism in experimental studies. Nutrients 2013;5(6):1937-48.
11. Akbaba G, Akbaba E, Sahin C, Kara M. The relationship between gestational diabetes mellitus and selenoprotein-P plasma 1 (SEPP1) gene polymorphisms. Gynecol Endocrinol 2018;34(10):849-52.
12. Mita Y, Nakayama K, Inari S, Nishito Y, Yoshioka Y, Sakai N, et al. Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. Nat Commun 2017;8(1):1-7.
13. Foster CB, Aswath K, Chanock SJ, McKay HF, Peters U. Polymorphism analysis of six selenoprotein genes: support for a selective sweep at the glutathione peroxidase 1 locus (3p21) in Asian populations. BMC genetics 2006;7(1):56.
14. Karunasinghe N, Han DY, Zhu S, Yu J, Lange K, Duan H,et al. Serum selenium and single-nucleotide polymorphisms in genes for selenoproteins: relationship to markers of oxidative stress in men from Auckland, New Zealand. Gene NuTr 2012;7(2):179-90.
15. Saito Y. Selenoprotein P as an in vivo redox regulator: disorders related to its deficiency and excess. J Clin Biochem Nutr 2019:19-31.
16. Speckmann B, Sies H, Steinbrenner H. Attenuation of hepatic expression and secretion of selenoprotein P by metformin. Biochem Biophys Res Commun 2009;387(1):158-63.
17. Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. Annu Rev Nutr 2005;25:215-35.
18. Degirmencioglu S, Tütenº A, Yüksel° MA, Yılmaz N, Gulyasarº T, Yıldız M, et al. The role of selenoprotein P and selenium in the etiopathogenesis of gestational diabetes mellitus: Association with selenoprotein P1 gene (rs3877899) polymorphism. Trace Elem Electrolytes 2018;35(4):174-82.
19. King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. Histochem Cell Biol 2004;122(4):333-8.
20. Donadio JL, Rogero MM, Guerra-Shinohara EM, Desmarchelier C, Borel P, Cozzolino SM. SEPP1 polymorphisms modulate serum glucose and lipid response to Brazil nut supplementation. Eur J Nutr 2018;57(5):1873-82.
21. Gharipour M, Ouguerram K, Nazih EH, Salehi M, Behmanesh M, Razavi R, et al. Effect of single nucleotide polymorphisms in SEPS1 and SEPP1 on expression in the protein level in metabolic syndrome in subjects with cardiovascular disease. Mol Biol Rep 2019;46(6):5685-93.
22. Steinbrenner H, Hotze AL, Speckmann B, Pinto A, Sies H, Schott M, et al. Localization and regulation of pancreatic selenoprotein P. J Mol Endocrinol 2013;50(1):31-42.
23. Misu H, Ishikura K, Kurita S, Takeshita Y, Ota T, Saito Y, et al. Inverse correlation between serum levels of selenoprotein P and adiponectin in patients with type 2 diabetes. PloS one 2012;7(4):e34952.
24. Yang SJ, Hwang SY, Choi HY, Yoo HJ, Seo JA, Kim SG, et al. Serum selenoprotein P levels in patients with type 2 diabetes and prediabetes: implications for insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. J Clin Endocrinol Metab 2011;96(8):E1325-9.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

Original Article

THE FREQUENCY OF RS877899 POLYMORPHISMS IN THE SEPP1 GENES AND TYPE 2 DIABETES, ITS RELATION TO BLOOD GLUCOSE LEVELS AND BLOOD SELENOPROTEINE P AND OXIDATIVE STRESS INDICES

Faranak Aryaei[1], Mohsen Firoozrai[2], Saeed Kalbasi[3]

Received: 28 February, 2021; Accepted: 27 September, 2021

Abstract

Background & Aims: Ala234Thr single nucleotide polymorphism can affect the level of oxidative stress capacity and serum selenium levels. On the other hand, blood glucose and insulin levels regulate the expression of SEPP1 gene. It is hypothesized that this polymorphism may be significantly associated with diabetes. The aim of this study was to determine the genotype of Ala234Thr polymorphism in patients with type 2 diabetes and its effect on glucose levels, selenoprotein p levels, and oxidative stress status of patients.

Materials & Methods: In this study, biochemical indices (FBS & HbA1C), and serum oxidative stress indices (MDA and total antioxidant capacity) were measured in both patient and healthy groups, and Tetra-ARMS PCR was used to determine the genotype of A234T polymorphism.

Results: There was no significant relationship between demographic indicators (age and gender) with the incidence of type 2 diabetes, but there was a significant relationship between biochemical indicators and oxidative stress ($p = 0.001$). Genotyping results showed that the frequency of GG genotype in the control group was higher than the patient group, but it was not statistically significant. It was also found that the risk of type 2 diabetes in people with GA genotype is 2.14 times higher than others ($p = 0.035$).

***Conclusion*:** The results demonstrated the effect of high levels of SEPP1 on the pathogenesis of type 2 diabetes through oxidative stress pathways. Rs3877899 polymorphism is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the subjects.

Keywords: Diabetes, Single nucleotide polymorphism, Oxidative stress, Hyperglycemia, Tetra-ARMS PCR

Address: Clinical biochemistry department, Medical faculty, Sharood Azad Islamic University, Shahrood, Iran
Tel: +982332390380
Email: faranak.aryaei@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(6): 436 ISSN: 2717-008X

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOI: 10.52547/umj.32.6.428]

[1] *Master of Science, Clinical Biochemistry Department, Medical Faculty, Sharood Azad Islamic University, Shahrood, Iran*
[2] *Professor, Clinical Biochemistry Department, Medical Faculty, Sharood Azad Islamic University, Shahrood, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*